

Actomyosin 溶液の Superprecipitation に関する研究

— 実験方法特に数量的取扱について* —

葛 西 健 治

札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

Studies on Superprecipitation of Actomyosin Solution

— On Its Quantitative Treatment —

By

KENJI KASAI

Department of Physiology, Sapporo University of Medicine

(Chief: Prof. T. NAGAI)

Various kinds of method of measuring the intensity of superprecipitation are revied, with special reference to quantitative 'treatment', with intention of presenting or otherwise advocating a new method as devised and utilized by us for 4 years.

A. Szent-Györgyi¹⁾ によつて発見された AM の superprecipitation は筋肉収縮の試験管内モデルと考えられているが、本現象の性質上定量的取扱いは困難であり、従来主として定性的報告が多い。

普通 superprecipitation (以下 superppt と略す) を観察するには 0.1 M KCl 環境において AM 0.15~0.5% に ATP 0.02~0.05% を添加して行なう。著者の経験によれば myosm B では 0.1 M KCl よりも 0.2 M KCl の方がよい²⁾。また合成 AM で行なうためには A. Szent-Györgyi も述べているように定型的な syneresis を生ぜしめるためには、actin, myosin, salt, ATP の添加順序が重要な要因となる。最も理想的な syneresis を生ぜしめるには 0.1 M KCl において 0.2~0.5% の myosin, 少量の Mg (0.0005 M), 0.02~0.05% の ATP を加え最後に F-actin を加えることが良いとされている³⁾。

superppt は AM 溶液に ATP を加えると直ちにほぼ water clear の状態になる (clear phase)。この間の普通数秒 (Mg の入った場合は数十秒ないし数分に及ぶことがある。) の短い間であり、まもなく net work を生じ aggregation の状態となる。そして終には縮小した plug となりその周囲は clear な状態となる。これが syneresis の状態である。

上述の如き superppt の数量的表現に関し先人の幾つかの報告がある。いずれも満足すべきものではないが、これ

について概略を述べ、またわれわれの方法を併記することにする。

I. 従来の方法

1) a) S. S. Spicer^{4), 5)} の方法: 氏は superppt に関して多くの業績を残したが、AM 試料の精製、実験方法の改良につれてその数量的表現も変遷している。次に順序を逐つてのべる。

i) plug の出来方により

明瞭なる plug がなかなか出現しなかつた時代に用いられていた。

excellent plug

loose plug

fine turbidity

coarse turbidity

ii) plug の大きさ

a×b (直径×長さ) で表わされた。

iii) 収縮の程度により

— : noncontractile, coarse precipitate

+: 1/3 complete contraction

++ : 2/3 complete contraction

+++ : complete contraction

T : fine turbidity

O : opalescence without gelation

G : gelation

等の記号が用いられた。

* 本研究にあつて、研究費の一部は文部省科学研究費並びに北海道総合開発局よりの科学研究費補助金によつた。ここに深甚の謝意を表する (永井)。

b) I. Banga⁵⁾の方法 (cit. Weber)
superppt の強さを arbitrary unit で×, ××, ×××, ×××× の記号で表わした。

2) 麦倉⁶⁾の方法: superppt の測定法として速度及び沈澱の高さ (脱水の程度) により半定量的に行なつた。

×: ATP の添加により雪片状の絮状物を生じているがまだ収縮を起さぬもの, いわゆる“agregation”

××: 収縮の過程にあるもの

×××: 収縮のほぼ最高に達したもの

一: ATP 添加により透光度は増加したが, 収縮に対応する何等の変化を示さぬもの

±: ATP 添加後 6 分で×の状態にあるもの

+: 6 分後××の状態にあるもの

++: 6 分以内に×××の状態にあるもの

+++: 4 分以内に×××の状態にあるもの

以上の記号を用いた。

3) a) Kuschinsky & Turba⁷⁾の方法: 外径 0.8 cm, 内径 0.28 cm, 長さ 17 cm の細管で superppt を起さしめ 1,500 r.p.m., 2 分間遠心沈澱を行ない沈澱した柱高を測定しその強度とした。

b) Sarkar⁸⁾の方法

前者と同様, 遠心沈澱を行ないその柱高を比較した。

II. 葛西の方法

Kuschinsky & Turba⁷⁾の方法はいろいろな長所を有するが, われわれが以前より考案し研究に用いている精度可成り高く且つ容易に行なえる方法を述べる。

実験方法

A. 材料

1) AM: A. Szent-Györgyi¹⁾ 法により兎肉より抽出し洗滌を 4 回繰返した。

2) ATP: A. Szent-Györgyi¹⁾ の方法により兎肉, 犬肉より抽出した。

B. 器具と方法

試験管は Fig. 1 の如き内径 1 cm, 長さ 10 cm の平底目盛付きのものを用い, 実験は 18°C の water bath 中で行ない温浴 10 分後に実験を開始する。18°C 以上になると形成された plug の内外に気泡を生じて浮上するために好ましくなく実験には 15~18°C が好適である。また試験管における反応混液の組成は実験の目的によつて異なるも全量はず 2 cc とする。普通の実験では, AM の最終蛋白濃度は 1.5 mg/cc

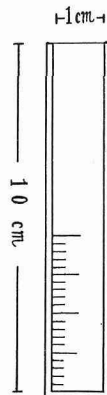


Fig. 1. Tube model for superprecipitation

(蛋白濃度 15mg/cc の myosin B を 0.2cc/2cc (全量) 入れる), ATP のそれは大体 $5 \times 10^{-4} M$ である (0.5% ATP 溶液を 0.1 cc/2 cc 入れる)。

各試験管のイオン強度は大体 0.1~0.25, 必要に応じて pH 7.5 の Michaelis 氏 veronal acetate buffer を 0.5 cc/2 cc (全量) 用いる。著者の経験によれば最も好適な superppt の起る条件はイオン強度 0.2, 上記の buffer の入つたものである。

温浴せる AM, ATP の入っていない反応混液 (KCl 溶液, 再蒸溜水, 必要あれば buffer, Mg, Ca 等のイオン類) に AM, ATP の順に加えて且つその都度充分に振盪して均一の溶液たらしめたものに superppt を起させ, 5 分後 (また clear phase の長いものをも比較する時はそれが superppt を起す充分な時間後) 10 秒間出来るだけ細かく振盪破碎し, それより一定時間後, 沈澱の占める体積を目盛の数值によつて較べる。目的によつては一定時間毎にこの操作を繰返してその都度に占める体積の変化により contraction の時間経過を逐うことが出来る。尚, 実験に用いる AM は myosin B, 合成 AM の何れでもかまはない。また Mg 等の入つた場合, clear phase がかなり長びくことがこの場合も必ず plug 形成後に振盪破碎して測定を行なう。

上記の方法を用いた実験成績は別報^{2), 9), 10)} の如くである。

摘 要

1) superprecipitation に関する従来の実験方法殊に数量的取扱ひについてのべた。

2) これに対してわれわれの考案, 慣用せる方法を述べた。

(昭和 31. 7. 5 受付)

文 献

- 1) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction 2nd ed. Acad. Press, New York (1951).
- 2) 葛西: 札幌医誌. 9, 146 (1956)
- 3) Spicer, S.S.: J. Biol. Chem. 199, 289 (1952).
- 4) Spicer, S.S.: Am. J. Physiol. 172, 671 (1953).
- 5) Banga, I.: cit H. H. Weber, Adv. Prot. Chem. 7, 224 (1952).
- 6) 麦倉: 札幌医誌 5, 175 (1954).
- 7) Kuschinsky, G. & Turba, F.: Biochem. Z. 321, 31 (1950).
- 8) Sarkar, N.K.: Enzymologia 14, 237 (1950).
- 9) 葛西: 札幌医誌投稿中。
- 10) 葛西: 札幌医誌投稿中。